

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-101280

(43) 公開日 平成9年(1997)4月15日

(51) Int.Cl. ⁹	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 27/327			G 0 1 N 27/30	3 5 3 J
27/416			27/46	3 5 3 R
				3 3 8

審査請求 未請求 請求項の数 5 F D (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平7-282363

(22) 出願日 平成7年(1995)10月5日

(71) 出願人 000001443

カシオ計算機株式会社

東京都新宿区西新宿2丁目6番1号

(71) 出願人 591010619

輕部 征夫

神奈川県川崎市宮前区東有馬1-3-16

(72) 発明者 当山 忠久

東京都八王子市石川町2951番地の5 カシ

オ計算機株式会社八王子研究所内

(72) 発明者 輕部 征夫

神奈川県川崎市宮前区東有馬1-3-16

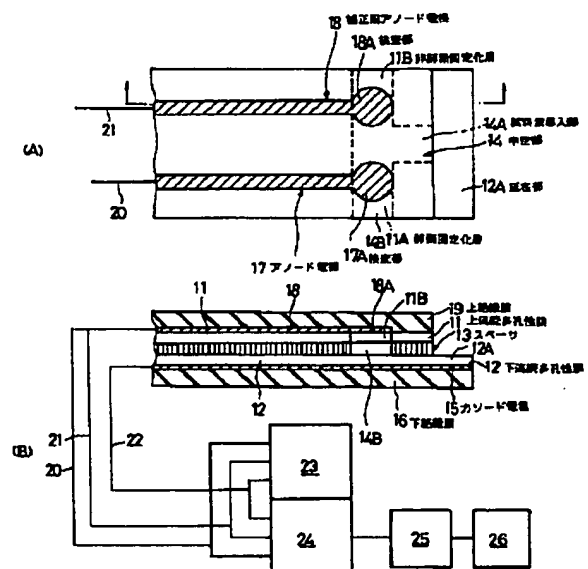
(74) 代理人 弁理士 杉村 次郎

(54) 【発明の名称】 バイオセンサ

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 試料液中に妨害物質が存在する場合での基質濃度の測定を確実にできるバイオセンサを提供する。

【解決手段】 上下連続多孔性膜11、12を介して、カソード電極15と、アノード電極17、補正用アノード電極18と、を対向配置し、アノード電極17に接触する上連続多孔性膜11に酵素固定化層11Aを形成することにより、アノード電極17と補正用アノード電極18との電流応答の差を取ることで、還元性物質の電解酸化電流を除去できるため、高濃度の妨害物質を含んだ試料液の基質濃度の測定が可能となる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 スペースにより互いに離間された一对の絶縁膜にそれぞれカソード電極及び白金からなるアノード電極が対向して形成され、前記アノード電極に測定する試料と化学反応を生じる酵素または酵素及びメディエータを含む酵素層が形成され、前記酵素層の少なくとも一側面には、前記スペースにより外部と連通されている試料導入空間が形成されていることを特徴とするバイオセンサ。

【請求項2】 前記カソード電極に対向して、前記酵素層と重ならない補正用アノード電極を備えることを特徴とする請求項1記載のバイオセンサ。

【請求項3】 前記酵素層は、柔軟性を有する多孔性膜であり、前記酵素または酵素及びメディエータは前記多孔性膜内に形成されていることを特徴とする請求項1または請求項2記載のバイオセンサ。

【請求項4】 一部が外部に露出している前記多孔性膜上にカソード電極が形成されていることを特徴とする請求項1～請求項3のいずれかに記載のバイオセンサ。

【請求項5】 前記試料はグルコースを含み、前記酵素層はグルコースオキシターゼを含むことを特徴とする請求項1～請求項4のいずれかに記載のバイオセンサ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】この発明は、バイオセンサに関する。

【0002】

【従来の技術】従来、この種のバイオセンサとしては、図5(A)、(B)に示すような構造のものが提案されている。このバイオセンサは、図に示すように、絶縁基板1の上に、例えばスクリーン印刷法により導電性カーボンペーストを印刷してなる作用極(アノード電極)2Aと、同じく導電性カーボンでなる対極(カソード電極)2Bと、が所定間隔を介して形成されている。作用極2Aは、矩形状であり、対極2Bはこの作用極2Aの三方を囲むような略コ字形状となっている。そして、作用極2Aの表面には、酸化還元酵素または、酸化還元酵素およびメディエータの両者、からなる酵素反応層3が形成されている。このバイオセンサを用いて試料液の基質濃度を測定するには、このバイオセンサを試料液に浸漬して、作用極2Aと対極2Bとの間に試料液が存在する状態で行う。このとき、酸化還元酵素の触媒作用により、基質が例えば酸化され、メディエータが還元される。そして、還元されたメディエータを電気化学的に酸化し、そのとき得られるメディエータの酸化電流を検出することにより、試料液中の基質濃度を求めるようになっている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、このようなバイオセンサを例えばグルコースセンサに適用した

場合、40mg/dl以下のグルコース濃度に対する電流応答が小さく、低濃度領域のグルコース測定が困難であった。また、還元性物質による妨害電流が生じ、還元性物質(例えば、アスコルビン酸など)を多く含む試料液の測定値が高くてであるという問題点があった。なお、このような問題は、グルコースセンサに限られるものではなく、他の基質濃度を測定する各種のバイオセンサにおいても同様であった。

【0004】この発明の課題は、所謂妨害物質を含んだ試料液中の基質濃度の測定を可能にするバイオセンサを得るにはどのような手段を講じればよいかという点にある。

【0005】

【課題を解決するための手段】

【0006】請求項1記載の発明は、バイオセンサにおいて、スペースにより互いに離間された一对の絶縁膜にそれぞれカソード電極及び白金からなるアノード電極が対向して形成され、前記アノード電極表面に測定する試料と化学反応を生じる酵素または酵素及びメディエータを含む酵素層が形成され、前記酵素層の少なくとも一側面には、前記スペースにより外部と連通されている試料導入空間が形成されていることを特徴とする。

【0007】したがって、酵素層が形成されているアノード電極を白金とすることにより、試料に含まれる被測定対象である基質の酵素反応に伴う酸化還元電流を鋭敏に検知すると共に試料に含まれる妨害物質に起因する電流の検知を低減することができるので、より精度の高い試料中の基質の測定を行なうことができる。また、試料導入空間が酵素層の少なくとも一側面に形成されているので迅速に試料を酵素層に到達することができる。

【0008】請求項2記載の発明は、前記カソード電極に対向して、前記酵素層と重ならない補正用アノード電極を備えることを特徴とする。

【0009】したがって、補正用アノード電極を用いて酵素反応と異なる反応により生じる電流を測定し、アノード電極とカソード電極との間に発生する電流から差し引くことにより、より精度の高いセンサを行なうことができる。

【0010】請求項3記載の発明は、前記酵素層は、柔軟性を有する多孔性膜であり、前記酵素または酵素及びメディエータは前記多孔性膜内に形成されている。

【0011】したがって、多孔質の酵素層であるので反応を起こす表面積が大きいので高感度に測定することができる。また、試料導入空間を狭小にすることができるので微量な試料でセンサすることができる。

【0012】請求項4記載の発明は、一部が外部に露出している前記多孔性膜上にカソード電極表面が形成されていることを特徴とする。

【0013】したがって、カソード電極側にも試料が導入することができ、迅速に測定することができる。

【0014】請求項5記載の発明では、前記試料はグルコースを含み、前記酵素層はグルコースオキシダーゼを含むことを特徴とする。

【0015】

【発明の実施の形態】以下、この発明に係るバイオセンサの詳細を図面に示す実施形態に基づいて説明する。

【0013】（実施形態1）図1（A）および（B）は、この発明の実施形態1を示している。図1（A）は、この実施形態のバイオセンサの平面説明図であり、図1（B）は同図（A）のB-B断面図である。

【0014】このバイオセンサの構成は、図1（B）に示すように、上連続多孔性膜31と下連続多孔性膜32とが、絶縁性材料でなる板状のスペーサ33を介して接合されている。これら上下連続多孔性膜31、32は、ポリテトラフルオロエチレンでなり、その膜厚は例えば20～200μmで、連続孔の孔径は0.2μmに設定されている。そして、下連続多孔性膜32には、上連続多孔性膜31の一側縁部より外側に突出する延在部32Aが形成されている。なお、スペーサ33には、図1（A）に破線で示すような平面略T字形状の、試料液導入空間としての中空部34が形成されている。この中空部34は、下連続多孔性膜32の延在部32Aの幅方向の中央の位置から内側に向けてスペーサ33を切り欠いた試料液導入部34Aと、この試料液導入部34Aに連通する、上下連続多孔性膜31、32の幅方向に沿ってスペーサ33を切り欠いた検査空間34Bと、から構成されている。

【0015】そして、下連続多孔性膜32の下面には、白金（Pt）でなるカソード電極35が全面に亘って形成されている。また、このカソード電極35の下面には、全面に亘って下絶縁膜36が形成されている。一方、上連続多孔性膜31の上面には、図1（A）に示すように、白金でなるアノード電極37が形成されている。このアノード電極37の一端部には、例えば径寸法が2.5mmの円形状の検査部37Aが形成されている。なお、アノード電極37における検査部37A以外の部分は、幅寸法が1mmの線状パターン37Bに形成されている。また、検査部37Aは、スペーサ33と上下連続多孔性膜31、32とで形成される検査空間34Bに、上連続多孔性膜31を介して臨むように配置されている。ところで、アノード電極37およびカソード電極35を形成するには、マグネツトスバッタリング法で白金膜を成膜する。この白金膜からアノード電極37をパターン形成するには、例えばメタルマスクまたはフォトリソグラフィ技術およびエッチング技術を用いればよい。そして、図1（A）に示すように、検査空間34Bに対応する部分の上連続多孔性膜31には、グルコースオキシダーゼ（GOD）と牛血清アルブミン（BSA）とが固定化されて、酵素固定化層31Aが形成されている。この酵素固定化層31Aは、上連続多孔性膜3

1の連続孔を酵素で塞いでしまうものではなく、基性であるグルコースがアノード電極17に到達し得るように連続孔が連通した状態を保つように固定化されている。このような酵素の固定化方法としては、架橋法や包括法などが知られている。本実施形態では、上下連続多孔性膜31、32をスペーサ33を介して張り合わせる前に、グルコース酸化酵素であるグルコースオキシダーゼ（GOD）と牛血清アルブミン（BSA）との混合溶液を、上連続多孔性膜31の検査空間34Aに臨む部分に、適量滴下し、乾燥後、グルタルアルデヒド蒸気中で架橋反応を行って酵素を固定化した。アノード電極37を覆うように上連続多孔性膜31の上面に上絶縁膜39が全面に亘って設けられている。

【0016】そして、図1（B）に示すように、カソード電極35は、リード線40を介して電圧印加回路41および電流測定回路42に接続されている。また、アノード電極37は、リード線43を介して電圧印加回路41および電流測定回路42に接続されている。

【0017】このような構成のグルコースセンサを用いて、試料液に対する電流応答を測定した。試料液としては、低濃度のグルコース標準溶液を10μl滴下して用いた。なお、試料液の滴下位置は、下連続多孔性膜32の延在部32A中央の試料液導入部34Aの入口位置である。このような位置に滴下すると、標準溶液は毛細管現象により、試料液導入部34Aに沿って検査空間34Bに取り込まれ、アノード電極37側に標準溶液が拡散して行く。そして、酵素固定化層31Aで酵素反応が起こり、グルコースが酸化されるとともに、過酸化水素が生成される。標準溶液が、対向するアノード電極37（検査部37A）とカソード電極35との間に十分染み込むのを待って、所定時間経過後、電極間に0.7Vの電圧を電圧印加回路41によって印加した。電圧印加により、電極間に過酸化水素の電解電流が流れる。電圧印加してから5秒後の電解電流を電流測定回路42により検出した。図2は、グルコース濃度0のときのバイアス電流キャンセル後の、グルコース濃度に対する電解電流値をプロットしたグラフである。このグラフから、グルコース濃度0～60mg/dlの低濃度領域で、非常に良い直線性が得られた。また、100mg/dlのアスコルビン酸溶液に対する応答は、約0.2μAとなり、従来のカーボンペースト電極の応答の約2.2μAより10分の1以下となり、アスコルビン酸の影響を著しく削減できた。

【0018】本実施形態では、電極材料に白金を用いたことにより、例えばアスコルビン酸などの妨害物質の影響を受けずに、低濃度の基質の濃度測定が可能となる。

【0019】（実施形態2）図3（A）はこの実施形態の平面図、図3（B）は同図（A）のA-A断面図である。本実施形態では、図に示すように、上連続多孔性膜11と下連続多孔性膜12とが、絶縁性材料でなる板状

のスペーサ13を介して接合されている。なお、下連続多孔性膜12は、上連続多孔性膜11の一侧縁部より外側に突出する延在部12Aが形成されている。なお、スペーサ13には、図3(A)に破線で示すような平面略T字形状の、試料液導入空間としての中空部14が形成されている。この中空部14は、下連続多孔性膜12の延在部12Aの幅方向の中央の位置から内側に向けてスペーサ13を切り欠いた試料液導入部14Aと、この試料液導入部14Aに連通する、上下連続多孔性膜11、12の幅方向に沿ってスペーサ13を切り欠いた検査空間14Bと、から構成されている。

【0020】そして、下連続多孔性膜12の下面には、例えば対向電極として導電性カーボンでなるカソード電極15が全面に互って形成されている。また、このカソード電極15の下面には、全面にわたって下絶縁膜16が形成されている。一方、上連続多孔性膜11の上面には、図3(A)に示すように、所定距離を介して、長手方向に沿って形成された、作用電極として白金でなるアノード電極17と、同じく白金でなる補正用アノード電極18とが形成されている。これらアノード電極17と補正用アノード電極18のそれぞれの一端部には、円形状の検査部17A、18Aが形成されている。この検査部17A、18Aは、スペーサ13と上下連続多孔性膜11、12とで形成される検査空間14Bに、上連続多孔性膜11を介して臨むように配置されている。そして、図3(A)に示すように、検査空間14Bのアノード電極17側の半分に対応する部分の上連続多孔性膜11には、グルコースオキシダーゼ(GOD)と牛血清アルブミン(BSA)とが固定化されて、酵素固定化層11Aが形成されている。また、検査空間14Bの補正用アノード電極18側の半分に対応する部分の上連続多孔性膜11には、牛血清アルブミン(蛋白質)のみが固定化されてなる非酵素固定化層11Bが形成されている。なお、これら酵素固定化層11A、非酵素固定化層11Bは、上連続多孔性膜11の連続孔を酵素等で塞いでしまうものではなく、基質であるグルコースがアノード電極17、補正用アノード電極18に到達し得るように連続孔が連通した状態を保つように固定化されている。そして、図3(B)に示すように、アノード電極17および補正用アノード電極18を覆うように上連続多孔性膜11の上面に上絶縁膜19が全面に互って設けられている。

【0021】なお、上記した酵素固定化層11A、非酵素固定化層11Bを形成する方法としては、それぞれの領域の上連続多孔性膜11に、グルコースオキシダーゼと牛血清アルブミンとの混合溶液、または牛血清アルブミン溶液を滴下し、乾燥を行った後、グルタルアルデヒド蒸気中で架橋反応を行って固定化する。

【0022】そして、図3(B)に示すように、カソード電極15は、リード線22を介して電圧印加回路23

および電流測定回路24に接続されている。また、アノード電極17は、リード線20を介して電圧印加回路23および電流測定回路24に接続されている。さらに、補正用アノード電極18は、リード線21を介して電圧印加回路23および電流測定回路24に接続されている。またさらに、電流測定回路24は、演算手段25および表示手段26に接続されている。

【0023】本実施形態では、アノード電極17に接触する部分の上連続多孔性膜11のみに酵素を固定化したため、電圧印加により例えば尿酸の酸化電流が生じて、アノード電極17と補正用アノード電極18との両方に流れ、酵素反応後に生じる過酸化水素の酸化電流はアノード電極17のみに流れるため、2つの電流の差を取れば、尿酸やその他の還元性物質による影響を除去することができる。具体的には、尿酸100mg/dl、グルコース10mg/dlの混合溶液に対する電流応答とグルコース10mg/dl溶液に対する電流応答の差は0.1μAとなり、グルコースの10倍濃度の尿酸を含むに拘わらず、その影響は著しく削減された。

【0024】また、作用電極であるアノードで17が白金でなるため、アスコルビン酸100mg/dl溶液に対する応答は、約0.2μAとなり、従来のカーボンペースト電極の応答の約2.2より10分の1以下となり、アスコルビン酸に起因する電流の影響を著しく低減することができた。

【0025】以上、実施形態2について説明したが、本実施形態においては、酵素を固定化したアノード電極17と、固定化しない補正用アノード電極18との電流応答の差を取ることで、還元性物質の電解酸化電流を除去できるため、高濃度の妨害物質を含んだ試料液、例えば唾液中のグルコース濃度の正確な測定が可能となる。また、酵素を固定化したアノード電極17と固定化しない補正用アノード電極18との電流応答の差を取ることで、基質濃度0のときに生じるバイアス電流を自動的に除去できるため、基質濃度0での応答を別に測定して、バイアス電流をキャンセルする必要がないという利点がある。

【0026】なお、上記実施形態では、アノード電極17の電流応答のそれぞれを検出し、その差を算出したが、それぞれの電流検出回路の後段に引き算回路を設け、直接差電流を検出するようにしても勿論よい。また、酵素の種類を変えることで、グルコース以外の基質のセンサとすることも可能である。さらに、酵素固定化層11Aは、酵素としてグルコースオキシダーゼのみを固定したが、これに加えてメディエータを共存させる構成としても勿論よい。この場合、酵素およびメディエータの酸化還元反応に伴う還元型メディエータの酸化電流を検出するバイオセンサを構築することができる。このバイオセンサでは、図4に示すように、グルコースを酸化させて還元型に変化した酵素GOD_{red}が元の酸化

型酵素GOD_{ox} 28に戻る際、メディエータが酵素から電子を奪い還元型メディエータM_{red} 29となる。そして、この還元型メディエータが電極反応によって酸化され、元の酸化型メディエータM_{ox} 30となる。すなわち、酵素とメディエータとが固定化されたアノード電極近傍に基質が存在すれば、酵素とメディエータとを仲介して電子がアノード電極へ移動し、グルコース濃度に応じた電流が流れる。従って、この電流を検出すればグルコース濃度を測定することができる。このようなバイオセンサの場合は、酵素とメディエータとをアノード電極近傍に共存させて固定化されているため、試料液中に溶存酸素が全くないか、あるいはその量が少ないときでも、グルコース濃度に応じた電流が流れるため、溶存酸素濃度に依存しないバイオセンサとすることができる。また、メディエータを介して電極と電子の授受を行うので、メディエータが無い場合に比べて印加電圧を低く抑えることができる。

【0027】また、上下連続多孔性膜11、12および上下絶縁膜19、16を柔軟性および可撓性を有する材料で形成することにより、例えば脛の下に挿入したり、歯に被せるなど、狭小な場所や凹凸のある場所での使用を可能にすることができる。さらに、連続多孔性膜の連続孔の径寸法を適宜設定することにより、例えばヘモグロビンや蛋白質などの高分子がアノード電極に到達することを防止することができる。このようにすれば、酵素固定化層内で発生した過酸化水素を効率よく検出することができる。

【0028】以上、実施形態1および実施形態2について説明したが、この発明はこれらに限定されるものではなく、構成の要旨に付随する各種の設計変更が可能である。例えば、上記実施形態1においてアノード電極、補*

*正用アノード電極およびカソード電極を白金で形成したが、アノード電極のみを白金で形成する構成としても勿論よい。また、上記実施形態1において、アノード電極全体を白金で形成したが、少なくとも酵素固定化層に接する電極表面だけに白金薄膜を形成する構成としてもよい。なお、上記実施形態1において、酵素固定化層は酵素としてグルコースオキシターゼのみを固定したが、これに加えてメディエータを共存させてもよい。

【0029】

10 【発明の効果】以上の説明から明かなように、この発明によれば、高濃度の妨害物質を含んだ試料液中の基質濃度の測定が可能となる。また、この発明によれば、試料液が微量での基質濃度の測定を可能にするという効果を奏する。

【図面の簡単な説明】

【図1】(A)はこの発明の実施形態1の平面説明図、(B)は(A)のA-A断面図。

【図2】実施形態1の測定結果を示すグラフ。

20 【図3】(A)はこの発明の実施形態2の平面説明図、(B)は(A)のB-B断面図。

【図4】メディエータを用いた酵素反応を示す説明図。

【図5】(A)は従来例の平面説明図、(B)は従来例の断面図。

【符号の説明】

11 上連続多孔性膜

12 下連続多孔性膜

13 スペース

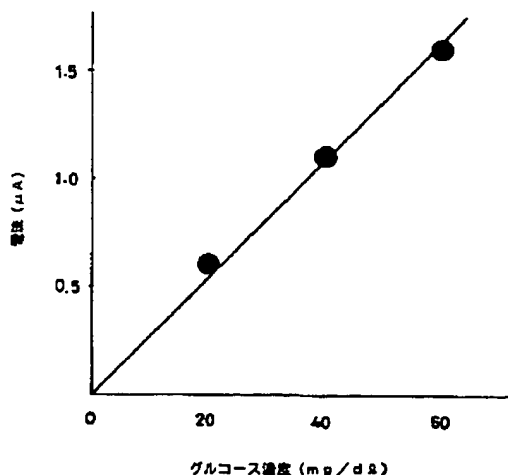
14 中空部

15 カソード電極

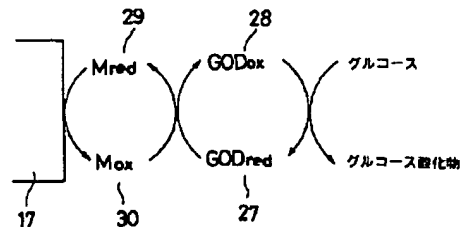
17 アノード電極

18 補正用アノード電極

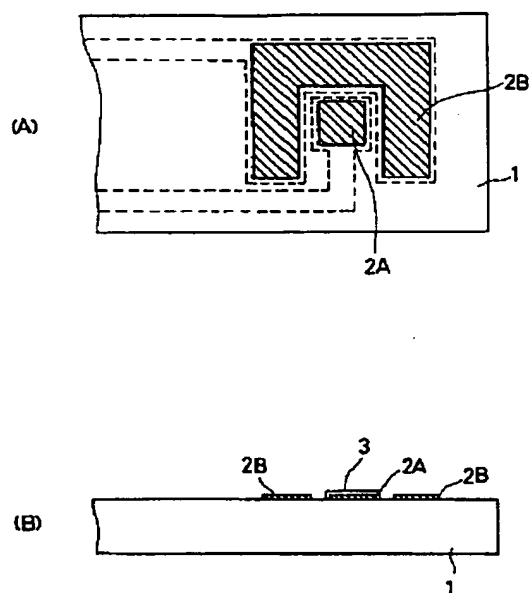
【図2】



【図4】



【圖5】



【圖 3】

